

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

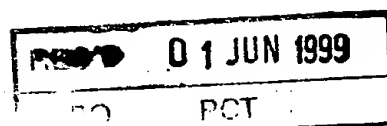
**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (uspto)**



FR 99 / 1165

09/720687

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

26 AVR. 1999

Fait à Paris, le .....

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

02155080

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



N° 55 -1328

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

<b>DATE DE REMISE DES PIÈCES</b> <b>22 MAI 1998</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> <b>À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b> <b>98 06456</b>		<b>CABINET ORES</b> <b>6 avenue de Messine</b> <b>75008 PARIS</b> <b>FRANCE</b>	
<b>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT</b> <b>22 MAI 1998</b>		<b>n° du pouvoir permanent</b> <b>références du correspondant</b> <b>téléphone</b> <b>MJPsd191/143</b> <b>01.45.52.75.00</b>	
<b>2 DEMANDE</b> Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° <b>Établissement du rapport de recherche</b> <input type="checkbox"/> diffère <input checked="" type="checkbox"/> immédiat La demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non <b>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</b> <b>SOUCHES MUTANTES DE LACTOBACILLUS BULGARICUS DEPOURVUES D'ACTIVITE</b> <b><math>\beta</math>-GALACTOSIDASE.</b>			
<b>3 DEMANDEUR (S)</b> n° SIREN <b>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</b> <b>COMPAGNIE GERVAIS DANONE</b>		<b>Forme juridique</b> <b>Société Anonyme</b>	
<b>Nationalité (s)</b> <b>FRANCAISE</b> <b>Adresse (s) complète (s)</b> <b>126, rue Jules Guesde</b> <b>92302 LEVALLOIS-PERRET</b>		<b>Pays</b> <b>FRANCE</b>	
<b>4 INVENTEUR (S)</b> Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
<b>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission.			
<b>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</b> pays d'origine : numéro : date de dépôt : nature de la demande :			
<b>7 DIVISIONS</b> antérieures à la présente demande n° : date : n° : date :			
<b>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (nom et qualité du signataire - n° d'inscription) <b>Marie-José VIALLE-PRESLES</b> (N° 93-2009), Mandataire		<b>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION</b> <b>SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</b>	

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

Le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur

MJP sdt 191/143

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

INPI DÉPÔSÉ RELEVÉ NATIONAL

98 06 456

**TITRE DE L'INVENTION :** SOUCHES MUTANTES DE LACTOBACILLUS BULGARICUS  
DEPOURVUES D'ACTIVITÉ  $\beta$ -GALACTOSIDASE.

**LE(S) SOUSSIGNÉ(S)**

**CABINET ORES**  
6 avenue de Messine  
75008 PARIS  
FRANCE

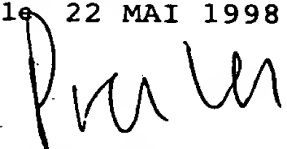
**DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S)** (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- **BENBADIS Laurent**  
7 avenue de Provence  
92160 ANTONY  
FRANCE
- **BRIGNON Pierre**  
7 rue des Brasseurs  
67200 STRASBOURG  
FRANCE
- **GENDRE François**  
49 rue du Maréchal Foch  
67200 STRASBOURG  
FRANCE

**NOTA :** A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) ~~du déposant~~ du mandataire

Paris, le 22 MAI 1998

  
Marie-José VIALLE-PRESLES (N° 93 2009)

**DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS**

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDEICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
28			X	24.08.98	01 SEP. 1998 - SR

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention « R.M. » (revendications modifiées).

SOUCHES MUTANTES DE *LACTOBACILLUS BULGARICUS* DEPOURVUES  
D'ACTIVITE  $\beta$ -GALACTOSIDASE.

Ces souches et ferments peuvent être utilisés pour l'obtention de produits laitiers fermentés à partir de lait additionné de glucose.

La présente Invention est relative à de nouveaux variants de *bulgaricus* et à leur utilisation pour la préparation de produits laitiers fermentés.

Les yoghourts sont traditionnellement obtenus par fermentation du lait avec une association de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Au cours de la fermentation qui est effectuée à une température d'environ 40 à 45°C, ces bactéries utilisent principalement le lactose comme substrat énergétique, et produisent de l'acide lactique qui entraîne la coagulation du lait ; lorsque le pH atteint une valeur d'environ 4,8 à 4,5, on met fin à cette étape de fermentation (également dénommée « acidification ») en refroidissant le produit. Celui-ci est ensuite maintenu au froid pendant la suite du processus de fabrication et de conditionnement, et jusqu'à sa consommation.

Cependant, le refroidissement ne stoppe pas complètement la fermentation lactique ; même lorsque le produit est maintenu à 4°C, on observe une augmentation progressive de son acidité au cours du temps.

Ce phénomène, connu sous le nom de post-acidification, est responsable d'une dégradation des qualités organoleptiques du produit pendant sa conservation.

La post-acidification résulte essentiellement de l'utilisation par les bactéries, et principalement par *L. bulgaricus*, du lactose restant dans le produit à l'issue de l'étape d'acidification contrôlée. Pour l'éviter, il a été proposé d'utiliser des souches de *L. bulgaricus* ne fermentant pas, ou très peu, le lactose.



Une des enzymes essentielles pour la fermentation du lactose est la  $\beta$ -galactosidase, qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose. Il a donc été proposé, pour obtenir des souches non-  
5 postacidifiantes de *L. bulgaricus*, de produire des mutants artificiels, ou de sélectionner des mutants naturels, chez lesquels l'activité de cette enzyme était affectée.

Par exemple, le Brevet EP 402 450 au nom de  
10 GENENCOR décrit l'obtention, par mutagénèse localisée du gène de la  $\beta$ -galactosidase, de mutants conditionnels de *L. bulgaricus*, chez lesquels la  $\beta$ -galactosidase qui est active lors de la fermentation à 40°C, perd son activité à la température ou au pH correspondant aux conditions de  
15 conservation des produits laitiers fermentés.

La Demande JP 90053437 décrit l'obtention d'un mutant artificiel de *L. bulgaricus* ayant complètement perdu la capacité de fermenter le lactose, et la sélection d'un mutant naturel, à capacité réduite de  
20 fermentation du lactose ; ces mutants sont néanmoins capables, l'un comme l'autre, de se développer et d'acidifier normalement en présence de *S. thermophilus*, à condition que le milieu soit supplémenté en glucose. Les sous-cultures de ces mutants conservent leurs  
25 caractéristiques d'acidification, dans du lait dépourvu de glucose, après 10 repiquages.

Le Brevet EP 0518 096, au nom de la SOCIETE DES PRODUITS NESTLE, propose d'utiliser pour la fabrication de yoghourt, des mutants faiblement  
30 postacidifiants de *Lactobacillus bulgaricus* préalablement sélectionnés sur le critère de la délétion d'un fragment du gène de la  $\beta$ -galactosidase. Le criblage et la caractérisation de ces mutants sont facilités, du fait que la présence de cette délétion peut être facilement  
35 vérifiés sur des profils de restriction. En outre, les délétions sont connues pour être des mutations

irréversibles, ce qui permet d'obtenir facilement des souches mutantes stables à partir de la souche mère. Le Brevet EP 0518 096 décrit 2 types de mutants faiblement postacidifiants sélectionnés de la sorte. Les premiers  
5 ont une délétion touchant uniquement le gène de la  $\beta$ -galactosidase ; lorsqu'ils sont associés à *S. thermophilus* et cultivés sur du lait, ils présentent, même en l'absence d'ajout de glucose, des propriétés de croissance et d'acidification comparables à celles de la  
10 souche sauvage dont ils sont issus. Les seconds présentent une délétion plus importante, s'étendant sur au moins 1kb en aval du gène de la  $\beta$ -galactosidase ; lorsqu'ils sont associés à *S. thermophilus* ils croissent plus lentement et acidifient beaucoup moins que la souche  
15 sauvage dont ils sont issus ; l'ajout de glucose au milieu de culture n'a que peu d'influence sur leurs propriétés d'acidification et de post-acidification.

Les mutants naturels chez lesquels la  $\beta$ -galactosidase est inactive sont beaucoup plus difficiles  
20 à sélectionner et à maintenir en cultures pures dans le cas de mutations ponctuelles que dans le cas de mutants de délétion ; ceci s'explique par la probabilité plus faible qu'une mutation ponctuelle produise une protéine inactive, par la plus grande difficulté pour localiser et  
25 caractériser les mutations ponctuelles par des profils de restriction, et par le taux de réversion très important.

La Demanderesse a maintenant trouvé d'autres mutants naturels de *L. bulgaricus*, ne portant pas de délétion dans le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase, et  
30 présentant des caractéristiques technologiques avantageuses. Dans le cadre de la présente invention, un mutant non-sens, incapable d'assimiler le lactose, a été isolé à partir d'une culture d'un *L. bulgaricus* sauvage. Associé à *S. thermophilus*, en culture sur du lait, il  
35 croît et acidifie beaucoup plus lentement que la souche sauvage dont il est issu. En revanche, sa croissance et

son acidification sont quasi-normales lorsque le lait est supplémenté en glucose.

La présente Invention a pour objet une souche mutante de *L. bulgaricus* dépourvue d'activité  
 5  $\beta$ -galactosidase, caractérisée en ce qu'elle porte une mutation introduisant un codon non-sens dans l'une des séquences codantes de l'opéron lactose et en particulier celle codant pour la  $\beta$ -galactosidase.

Une souche de *L. bulgaricus* conforme à  
 10 l'invention a été déposée selon le Traité de Budapest le 14 janvier 1998, auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, à Paris, sous le numéro I-1968.

15 Cette souche présente les caractéristiques morphologiques et biochimiques suivantes :

- Morphologie : Microorganisme Gram-positif, bacilles fins, pléomorphes, asporogènes, isolés ou en courtes chaînes, immobiles.
- 20 - Métabolisme : homofermentaire, catalase (-).
- Fermentation des sucres : D-glucose (+), D-fructose (+), D-mannose (+), esculine (+).

Les Inventeurs ont séquencé l'opéron lactose chez le mutant I-1968. La séquence correspondante est  
 25 représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1. Les séquences des produits de traduction (perméase et  $\beta$ -galactosidase) sont respectivement représentées sous les numéros SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3

30 L'analyse de cette séquence fait apparaître deux mutations ponctuelles : l'une, au niveau du gène de la perméase (position 122 de la séquence SEQ ID NO:1), induit un changement d'acide aminé (Lys  $\rightarrow$  Asn) ; l'autre, au niveau du gène de la  $\beta$ -galactosidase (position 4519 de  
 35 la séquence SEQ ID NO:1), introduit un codon de terminaison. Bien que conservant ses sites actifs

(positions 464 et 531), la  $\beta$ -galactosidase produite par ce mutant est inactive. Les Inventeurs ont en outre constaté que cette mutation restait stable après plusieurs séries de repiquages sur un milieu de culture  
5 contenant du glucose. En revanche, sur un milieu de culture en absence de glucose, cette mutation non-sens réverte très rapidement à un taux d'environ  $10^{-6}$ .

La présente invention englobe également des souches mutantes incapables d'assimiler le lactose,  
10 dérivées de la souche I-1968. De telles souches peuvent par exemple être obtenues en induisant par mutagénèse dirigée, d'autres mutations dans l'opéron lactose de la souche I-1968.

La présente Invention a également pour objet  
15 un ferment lactique, en particulier un ferment du yoghourt, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche de *L. bulgaricus* conforme à l'Invention telle que définie ci-dessus, de préférence associée à au moins une souche de *S. thermophilus*.

20 Pour l'obtention d'un ferment conforme à l'invention, on peut utiliser n'importe quelle souche de *S. thermophilus* convenant pour la fabrication de yoghourt ; le choix d'une ou plusieurs souches de *S. thermophilus* peut être effectué en fonction des  
25 caractéristiques additionnelles que l'on souhaite éventuellement conférer au produit fini.

A titre d'exemple de souches de *S. thermophilus* pouvant être utilisées en association avec une souche de *L. bulgaricus* conforme à l'invention,  
30 on peut citer les souches suivantes, déposées auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, à Paris :

- la souche déposée le 25 août 1994, sous le  
35 numéro I-1470, et la souche déposée le 23 août 1995, sous

le numéro I-1620 ; ces 2 souches sont décrites dans la Demande Européenne publiée sous le numéro 96/06924 ;

- les souches déposées le 30 décembre 1994, sous les numéros I-1520 et I-1521 ; ces 2 souches sont  
5 décrites dans la Demande Internationale PCT WO 96/20607 :

- la souche déposée le 24 octobre 1995 sous le numéro I-1630 ; les caractéristiques de cette souche sont décrites dans la Demande Internationale PCT WO 96/01701.

Ces souches peuvent être associées entre  
10 elles, ou avec une ou plusieurs autres souches industrielles de *S. thermophilus*.

La ou les souche(s) de *S. thermophilus* sont associées avec la ou les souche(s) de *L. bulgaricus* conformes à l'invention de la même manière et dans les  
15 mêmes proportions que dans les ferments du yoghourt traditionnels ; la population de bactéries *L. bulgaricus* conformes à l'invention peut par exemple représenter entre 10 et 90%, de préférence entre 20 et 50%, de la population bactérienne totale.

20 La présente Invention a également pour objet un procédé de préparation d'un produit laitier fermenté caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on fermente du lait à l'aide d'un ferment comprenant au moins une souche de *L. bulgaricus* conforme  
25 à l'Invention, en présence d'au moins un sucre assimilable par ladite souche ; il peut s'agir notamment du fructose, du mannose, et de préférence, du glucose. Avantagement ledit produit laitier fermenté est un yoghourt.

30 Le procédé conforme à l'Invention est similaire aux procédés traditionnels de préparation du yoghourt en ce qui concerne les principales modalités de mise en œuvre de l'étape d'acidification contrôlée ; en particulier cette acidification est effectuée à une  
35 température comprise entre 20 et 45°C, et de préférence entre 30 et 45°C, et en « batch », c'est à dire en une

seule étape et en utilisant une seule cuve de fermentation.

La durée de cette étape d'acidification contrôlée est généralement de l'ordre de 6 à 24 heures, et de préférence de l'ordre de 6 à 16 heures ; elle est donc plus longue que dans le cas des procédés classiques de préparation de yoghourt (où elle est de 3 à 5 heures à 44°C). En effet, les souches de *L. bulgaricus* conformes à l'Invention, même associées à *S. thermophilus*, croissent et acidifient beaucoup plus lentement que les souches sauvages.

En outre, la vitesse de croissance et d'acidification des souches de *L. bulgaricus* conformes à l'invention varie très significativement en fonction de la quantité de glucose ajoutée au lait. Cette propriété permet de contrôler leur croissance et leur acidification, par simple addition de la quantité souhaitée de glucose en début de fermentation.

Les Inventeurs ont en outre observé que, lors de la mise en oeuvre de souches de *L. bulgaricus* ou de ferments conformes à l'Invention, l'acidification ralentit considérablement lorsque le pH atteint la zone de 4,8 à 4,5, (qui correspond à la zone de pH où l'on arrête l'acidification dans le cas d'un procédé traditionnel), et se stabilise, même si l'on maintient le lait à température de fermentation, à un pH plancher. La valeur de ce pH plancher dépend essentiellement de la quantité de glucose ajoutée.

Cette propriété permet de réduire, voire d'éliminer la phase de refroidissement utilisée dans les procédés traditionnels de fabrication du yoghourt pour stopper la fermentation. Elle supprime en outre la nécessité de mesurer le pH pour déterminer le moment optimal d'arrêt de la fermentation ; pour un ferment et une quantité de glucose ajoutés déterminés, il est possible, sans risque de sur-acidification, d'arrêter la

fermentation au bout d'une durée donnée, calculée en fonction du temps nécessaire pour atteindre le pH plancher. Ceci permet de mieux contrôler la régularité du pH final et la texture du produit en fin de fermentation.

5           Avantageusement, pour la mise en œuvre du procédé conforme à l'invention, et selon le degré d'acidification auquel on souhaite parvenir, la quantité de glucose ajoutée au lait préalablement à la fermentation est comprise entre 0,5 et 10 g/l, de  
10           préférence entre 0,5 et 5 g/l.

          Le produit fermenté obtenu de la sorte peut être conservé plusieurs heures à une température proche de la température de fermentation, sans baisse du pH, ce qui permet de supprimer les installations de stockage  
15           intermédiaire au froid et d'augmenter la capacité des cuves de fermentation.

          La mise en œuvre du procédé conforme à l'Invention permet de réduire la postacidification dans les produits fermentés au cours de leur conservation à  
20           plus long terme. Le degré de postacidification peut varier selon la composition du ferment et la quantité de glucose utilisée. Cependant la postacidification est toujours nettement inférieure à celle observée dans le cas des yaourts obtenus avec les ferments et les procédés  
25           traditionnels.

          Par exemple, des expérimentations effectuées par les Inventeurs ont montré que dans les mêmes conditions de conservation (28 jours de conservation à 10°C), le  $\Delta$ pH (différence entre le pH à J0 et le pH à  
30           J28) était compris entre 0,05 et 0,4 dans le cas des produits obtenus à l'aide d'un ferment conforme à l'invention, alors qu'il était toujours supérieur à 0,7 dans le cas de ferments témoins dans lesquels la souche de *L. bulgaricus* conforme à l'invention était remplacée  
35           par une souche sauvage.

Cette faible post-acidification s'accompagne d'une bonne survie des souches du ferment ; la population de *L. bulgaricus* en fin de conservation, dans le produit fermenté obtenu conformément à l'invention n'est que  
 5 légèrement inférieure à celle du produit témoin.

La présente invention a également pour objet les produits laitiers fermentés susceptibles d'être obtenus en mettant en œuvre un procédé conforme à l'invention.

10 Ces produits peuvent se conserver pendant plus longtemps et à température plus élevées que les produits obtenus par les procédés traditionnels, et possèdent des caractéristiques organoleptiques qui restent stables au cours de la conservation.

15 **EXEMPLE 1 : DOSAGE BIOCHIMIQUE DE L'ACTIVITE BETA-GALACTOSIDASE D'UN MUTANT CONFORME A L'INVENTION.**

L'activité  $\beta$ -galactosidase de la souche I-1968 a été comparée à celle de la souche sauvage de *L. bulgaricus* (dénommée ci-après LbS) dont elle est  
 20 issue.

On cultive les bactéries pendant une nuit sur milieu MRS agar (MERCK) à 37°C, en jarre d'anaérobiose (MERCK) en présence d'un fixateur d'oxygène (Anaéroculta, MERCK).

25 Une ôse de 10 microlitres (NUNC) de bactéries est resuspendue dans 1 millilitre d'eau stérile. Les bactéries sont lysées par 2 cycles d'agitation forte, 20 secondes à 5000 rotations par minute en présence de microbilles de verre (0,5 mm de diamètre, BIOSPEC  
 30 PRODUCTS), puis rajout de 0,15 ml de chloroforme. On agite l'ensemble pendant 30 minutes à 37°C, puis on complète à 2 ml avec de l'eau stérile à 4°C. L'activité bêta-galactosidase est alors mesurée : à partir de 0,2 ml de la suspension cellulaire on rajoute 1,2 ml de tampon  
 35  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,067M ; pH 6,8 ; 0,05 ml de L-cystéine (SIGMA) à t0 0,05 ml de O-nitrophényl-bêta-D-galactopyranoside



(SIGMA). La réaction enzymatique est arrêtée après 0, 2, 5 ou 10 min. par 1 ml de tampon  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10%, et on effectue une mesure de la DO à 400 nanomètres sur le surnageant, après centrifugation du milieu réactionnel.

5 Les activités galactosidase de la souche-mère LbS et du mutant I-1968 conforme à l'Invention mesurées en fonction du temps sont représentées sur la Figure 1.

Ces résultats montrent que la  $\beta$ -galactosidase est totalement inactive chez le mutant conforme à l'Invention.

#### EXEMPLE 2 : STABILITE DU MUTANT I-1968 DE *L. BULGARICUS*

La stabilité du mutant I-1968 a été testée dans des milieux contenant comme sources de carbone soit un mélange de glucose et de lactose, soit du lactose  
15 seulement.

Une culture de I-1968 obtenue sur milieu MRS contenant du glucose est mise en sous-culture sur du lait stérilisé additionné d'autolysat de levure (2g/l), et supplémenté ou non avec du glucose (20g/l). Lorsqu'un pH de 5,2  
20 (coagulation du lait) est atteint, on prélève des échantillons de chaque sous-culture, sur lesquels on analyse la capacité des bactéries à fermenter les sucres, ainsi que la présence d'activité  $\beta$ -galactosidase (test sur plaque X-gal : colonies blanches =  $\beta$ -galactosidase moins ; colonies bleues =  $\beta$ -galactosidase plus).

25 Les résultats sont illustrés par le Tableau I ci-dessous.

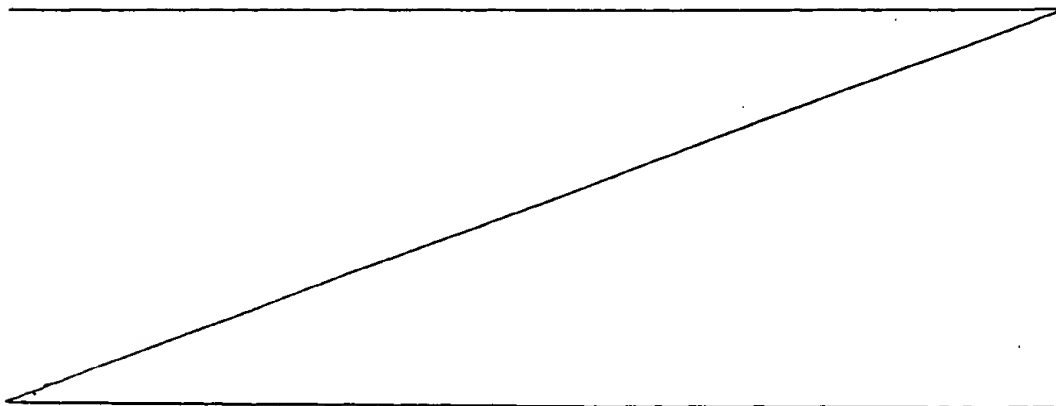


TABLEAU I

Milieu	Lait + glucose (20g/l)	Lait
Temps pour atteindre pH 5.2	6h00	20h00
Fermentation des sucres	glucose, fructose, mannose	lactose, glucose, fructose, mannose
Test sur plaque X- gal	100% Colonies blanches	20% colonies blanches 80% colonies bleues

Ces résultats montrent qu'en présence de glucose, la souche I-1968 ne réverte pas vers une souche capable d'utiliser le lactose. En revanche dans un milieu  
5 contenant du lactose comme seule source de carbone, on observe une réversion rapide de la souche I-1968 vers l'état original.

EXEMPLE 3 : PROPRIETES D'ACIDIFICATION, DE  
POSTACIDIFICATION ET DE SURVIE DU VARIANT I-1968 DE  
10 *L. BULGARICUS* EN SYMBIOSE AVEC *S. THERMOPHILUS* : CAS D'UN  
PROCÉDE DE FABRICATION D'UN YOGHOURT FERME (FERMENTATION  
EN ETUVE VENTILEE)

On prépare des ferments de yoghourt associant la souche I-1968 conforme à l'Invention avec différentes  
15 souches industrielles de *S. thermophilus* (les souches de *S. thermophilus* utilisées sont dénommées ci-après ST1, ST2 et ST3).

A titre de comparaison, on prépare des ferments associant la souche-mère LbS, et les mêmes  
20 souches de *S. thermophilus*.

Pour la préparation des ferments, les souches sont ensemencées séparément à 1% sur la composition suivante :

Composition pour 1 litre :

25 135 g de poudre de lait écrémé  
2 g d'autolysat de levure

920 ml d'eau distillée

20 g de glucose (pour la souche I-1968 uniquement)

Hydratation: 10 min

Pasteurisation: 30 min à 95°C

- 5 Le lait est ensuite refroidi à 44°C et inoculé, puis incubé à 44°C jusqu'à obtention d'une acidité de 85°D (degrés Dornic) pour les streptocoques et de 80°D pour les lactobacilles.

- 10 Les cultures sont ensuite réunies pour obtenir un ferment constitué à 80% de *Streptococcus thermophilus* et à 20% de *Lactobacillus bulgaricus*.

Les ferments ainsi obtenus sont utilisés pour inoculer la préparation suivante :

Composition pour 1 litre :

- 15 99% de lait

0, 1, ou 2 g/l de glucose

Hydratation: 10 min

Pasteurisation: 10 min à 95°C

- 20 Le lait est ensuite refroidi à 44°C et inoculé à 1%.

Pour chaque expérimentation, la composition du ferment et la quantité de glucose ajoutée sont indiquées dans le Tableau II ci-dessous :

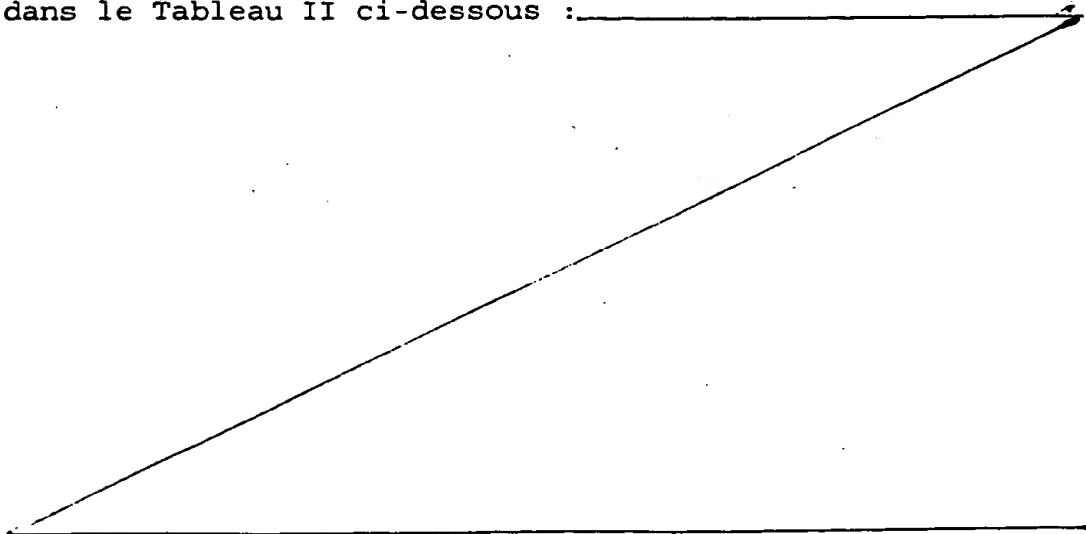


TABLEAU II

Expéri nce	Glucos g/l	Souch s	Pourcentag
1	0	ST 3 ST 2 LbS	64 % 16 % 20 %
2	0	ST 3 ST 2 I-1968	64 % 16 % 20 %
3	1	ST 3 ST 2 I-1968	64 % 16 % 20 %
4	0	ST 1 LbS	80 % 20 %
5	0	ST 1 I-1968	80 % 20 %
6	2	ST 1 I-1968	80 % 20 %

Après inoculation, le lait est réparti en ballons et incubé à une température de 44°C. Le profil d'acidification est suivi pendant l'incubation. Les produits sont décaillés à pH 4,6 par refroidissement en cellule froide (16 heures à 4°C).

Les produits sont ensuite soumis à un test de conservation à 10°C. Dans ce test, on mesure le pH et l'acidité Dornic après 1, 14, 21 et 28 jours de conservation.

Les résultats d'acidification (temps pour atteindre un pH de 4,6 et valeur du pH à 24h) sont présentés dans le tableau III ci-dessous :

TABLEAU III

Expérience	Temps pour atteindre pH 4,6 (min)	Temps pour atteindre pH 4,5 (min)	pH à 24h
1	215	236	3,67
2	550	778	4,33
3	416	507	4,26
4	225	241	3,67
5	660	>1500	4,54
6	390	465	4,35

Les résultats du test de conservation à 10°C (suivi du pH et de l'acidité Dornic), et de la survie

(populations de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*) à 28 jours sont présentés dans le tableau IV ci-dessous :

TABLEAU IV

Expérience	Temps de stockage (jours)	pH	Acidité Dornic	<i>Streptococcus thermophilus</i> cellules/ml	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> cellules/ml
1	1	4,41	101	7,25E+08	3,35E+08
1	14	3,98	140	ND	ND
1	21	3,95	145	ND	ND
1	28	3,9	148	7,35E+08	3,30E+08
2	1	4,5	93	5,60E+08	2,90E+07
2	14	4,23	110	ND	ND
2	21	4,18	112	ND	ND
2	28	4,19	114	5,65E+08	1,87E+07
3	1	4,49	96	6,90E+08	7,45E+07
3	14	4,14	115	ND	ND
3	21	4,15	117	ND	ND
3	28	4,15	120	8,65E+08	6,30E+07
4	1	4,39	105	6,30E+07	4,40E+08
4	14	3,91	145	ND	ND
4	21	3,9	151	ND	ND
4	28	3,85	157	4,70E+08	6,40E+08
5	1	4,6	85	9,05E+08	6,70E+07
5	14	4,58	80	ND	ND
5	21	4,53	80	ND	ND
5	28	4,61	79	9,40E+08	7,00E+07
6	1	4,51	89	1,05E+09	1,96E+08
6	14	4,38	90	ND	ND
6	21	4,39	96	ND	ND
6	28	4,42	90	1,62E+09	1,91E+08

ND : Non Déterminé

- 5 Ces résultats montrent que les yoghourts réalisés avec les symbioses associant la souche I-1968 à une ou deux souches de *S. thermophilus* présentent une postacidification extrêmement réduite par rapport aux mêmes symbioses avec la souche-mère LbS, tout en conservant une population abondante en fin de fermentation et une bonne survie pendant 28 jours à 10°C.

- 10 L'arrêt de l'acidification et le maintien du pH aux alentours de 4,6 à 4,5 pendant au moins 24 heures à 44°C permet dans le cadre de la fabrication de yoghourt brassé, de réduire, voire d'éliminer la phase de refroidissement en cuve qui est
- 15 habituellement mise en œuvre.

## LISTE DE SEQUENCES

NOMBRE DE SEQUENCES: 3

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5059 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 122..1873

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 1877..4519

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GCTTGTCTCA CGCTTGTCGT ACGCGGCCGG TGCCTTTGGC AACGACGTCT TCTACGCGAC	60
TCTGTCAACC TACTTTATCG TCTTCGTCAC CACCCACCTC TTTAATGCCG GTGACCACAA	120
G ATG ATC TTT ATC ATC ACC AAC TTG ATC ACC GCC ATC CGG ATC GGG	166
Met Ile Phe Ile Ile Thr Asn Leu Ile Thr Ala Ile Arg Ile Gly	
1 5 10 15	
GAA GTC CTG CTC GAC CCC TTG ATC GGT AAC GCC ATC GAC CGG ACC GAA	214
Glu Val Leu Leu Asp Pro Leu Ile Gly Asn Ala Ile Asp Arg Thr Glu	
20 25 30	
AGC CGG TGG GGG AAG TTC AAG CCC TGG GTT GTG GGC GGG GGG ATC ATC	262
Ser Arg Trp Gly Lys Phe Lys Pro Trp Val Val Gly Gly Gly Ile Ile	
35 40 45	
AGC TCA TTA GCC CTC TTA GCC CTC TTT ACC GAC TTT GGC GGC ATT AAC	310
Ser Ser Leu Ala Leu Leu Ala Leu Phe Thr Asp Phe Gly Gly Ile Asn	
50 55 60	
CAA AGC AAC CCC GTT GTT TAC TTA GTA ATC TTC GGT ATT GTT TAC TTG	358
Gln Ser Asn Pro Val Val Tyr Leu Val Ile Phe Gly Ile Val Tyr Leu	
65 70 75	
ATT ATG GAT ATC TTC TAC TCA TTT AAA GAC ACT GGC TTC TGG GCC ATG	406
Ile Met Asp Ile Phe Tyr Ser Phe Lys Asp Thr Gly Phe Trp Ala Met	
80 85 90 95	
ATC CCG GCC TTG TCC CTG GAT TCC CGG GAA AGA GAG AAG ACC TCC ACC	454
Ile Pro Ala Leu Ser Leu Asp Ser Arg Glu Arg Glu Lys Thr Ser Thr	
100 105 110	

TTC	GCC	AGA	GTC	GGC	TCC	ACC	ATC	GGG	GCC	AAC	CTG	GTC	GGG	GTA	GTC	502
Phe	Ala	Arg	Val	Gly	Ser	Thr	Ile	Gly	Ala	Asn	Leu	Val	Gly	Val	Val	
			115					120					125			
ATC	ACC	CCA	ATC	ATC	CTC	TTC	TTC	TCG	GCC	AGC	AAG	GCC	AAC	CCC	AAC	550
Ile	Thr	Pro	Ile	Ile	Leu	Phe	Phe	Ser	Ala	Ser	Lys	Ala	Asn	Pro	Asn	
		130					135					140				
GGG	GAT	AAG	CAG	GGC	TGG	TTC	TTC	TTT	GCC	TTG	ATC	GTG	GCC	ATT	GTC	598
Gly	Asp	Lys	Gln	Gly	Trp	Phe	Phe	Phe	Ala	Leu	Ile	Val	Ala	Ile	Val	
	145					150					155					
GGC	ATC	TTG	ACC	TCA	ATT	ACC	GTT	GGT	CTT	GGT	ACT	CAC	GAA	GTA	AAA	646
Gly	Ile	Leu	Thr	Ser	Ile	Thr	Val	Gly	Leu	Gly	Thr	His	Glu	Val	Lys	
160					165				170						175	
TCC	GCC	CTG	CGG	GAA	AGC	AAT	GAA	AAG	ACC	ACT	TTG	AAG	CAG	GTC	TTT	694
Ser	Ala	Leu	Arg	Glu	Ser	Asn	Glu	Lys	Thr	Thr	Leu	Lys	Gln	Val	Phe	
			180					185					190			
AAG	GTC	CTG	GGG	CAA	AAC	GAC	CAG	CTC	CTC	TGG	CTG	GCC	TTT	GCC	TAC	742
Lys	Val	Leu	Gly	Gln	Asn	Asp	Gln	Leu	Leu	Trp	Leu	Ala	Phe	Ala	Tyr	
		195					200					205				
TGG	TTT	TAC	GGC	CTG	GGT	ATC	AAC	ACC	CTG	AAC	GCT	CTG	CAA	CTT	TAC	790
Trp	Phe	Tyr	Gly	Leu	Gly	Ile	Asn	Thr	Leu	Asn	Ala	Leu	Gln	Leu	Tyr	
	210					215					220					
TAC	TTC	TCA	TAC	ATC	TTA	GGC	GAT	GCC	CGC	GGC	TAC	AGC	CTG	CTT	TAC	838
Tyr	Phe	Ser	Tyr	Ile	Leu	Gly	Asp	Ala	Arg	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Tyr	
	225					230					235					
ACC	ATC	AAC	ACC	TTT	GTC	GGT	TTA	ATC	TCT	GCA	TCC	TTC	TTC	CCA	TCA	886
Thr	Ile	Asn	Thr	Phe	Val	Gly	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Phe	Pro	Ser	
240					245				250						255	
CTG	GCC	AAG	AAG	TTC	AAC	AGA	AAT	CGC	CTC	TTC	TAC	GCC	TGC	ATC	GCG	934
Leu	Ala	Lys	Lys	Phe	Asn	Arg	Asn	Arg	Leu	Phe	Tyr	Ala	Cys	Ile	Ala	
			260					265					270			
GTG	ATG	CTG	TTA	GGG	ATC	GGG	GTC	TTC	TCC	GTG	GCC	AGC	GGT	TCT	CTG	982
Val	Met	Leu	Leu	Gly	Ile	Gly	Val	Phe	Ser	Val	Ala	Ser	Gly	Ser	Leu	
		275					280					285				
GCC	CTG	TCC	CTT	GTT	GGG	GCA	GAA	TTC	TTC	TTT	ATT	CCG	CAG	CCT	CTG	1030
Ala	Leu	Ser	Leu	Val	Gly	Ala	Glu	Phe	Phe	Phe	Ile	Pro	Gln	Pro	Leu	
	290					295					300					
GCC	TTC	CTG	GTC	GTT	TTG	ATG	ATC	ATC	TCT	GAC	GCT	GTT	GAA	TAC	GGC	1078
Ala	Phe	Leu	Val	Val	Leu	Met	Ile	Ile	Ser	Asp	Ala	Val	Glu	Tyr	Gly	
	305				310				315							
CAG	CTG	AAA	ACT	GGC	CAC	AGA	GAC	GAA	GCT	TTG	ACC	CTG	TCT	GTC	CGG	1126
Gln	Leu	Lys	Thr	Gly	His	Arg	Asp	Glu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Val	Arg	
320					325				330						335	

CCA TTG GTC GAT AAG CTG GGC GGG GCC TTG TCC AAC TGG TTT GTT TCC	1174
Pro Leu Val Asp Lys Leu Gly Gly Ala Leu Ser Asn Trp Phe Val Ser	
340 345 350	
TTG ATT GCC TTA ACT GCC GGC ATG ACC ACT GGG GCG ACT GCC TCA ACA	1222
Leu Ile Ala Leu Thr Ala Gly Met Thr Thr Gly Ala Thr Ala Ser Thr	
355 360 365	
ATT ACA GCT CAT GGC CAG ATG GTC TTC AAG TTA GCT ATG TTT GCC TTA	1270
Ile Thr Ala His Gly Gln Met Val Phe Lys Leu Ala Met Phe Ala Leu	
370 375 380	
CCG GCA GTC ATG CTC TTG ATC GCT GTT TCT ATT TTC GCC AAA AAG GTC	1318
Pro Ala Val Met Leu Leu Ile Ala Val Ser Ile Phe Ala Lys Lys Val	
385 390 395	
TTC TTG ACT GAA GAA AAG CAC GCG GAA ATC GTC GAC CAG CTG GAA ACT	1366
Phe Leu Thr Glu Glu Lys His Ala Glu Ile Val Asp Gln Leu Glu Thr	
400 405 410 415	
CAA TTC AGC CAA AGC CAT GCC CAA AAG CCG GCG CAA GCT GAA AGC TTC	1414
Gln Phe Ser Gln Ser His Ala Gln Lys Pro Ala Gln Ala Glu Ser Phe	
420 425 430	
ACT TTG GCC AGC CCA GTC TCC GGA CAA TTA ATG AAC CTG GAC ATG GTT	1462
Thr Leu Ala Ser Pro Val Ser Gly Gln Leu Met Asn Leu Asp Met Val	
435 440 445	
GAC GAC CCG GTC TTT GCC GAC AAA AAG TTA GGC GAC GGC TTT GCC CTG	1510
Asp Asp Pro Val Phe Ala Asp Lys Lys Leu Gly Asp Gly Phe Ala Leu	
450 455 460	
GTG CCA GCA GAC GGT AAG GTC TAC GCG CCA TTT GCC GGT ACT GTC CGC	1558
Val Pro Ala Asp Gly Lys Val Tyr Ala Pro Phe Ala Gly Thr Val Arg	
465 470 475	
CAG CTG GCC AAG ACC CGG CAC TCG ATC GTC CTG GAA AAT GAA CAT GGG	1606
Gln Leu Ala Lys Thr Arg His Ser Ile Val Leu Glu Asn Glu His Gly	
480 485 490 495	
GTC TTG GTC TTG ATT CAC CTT GGC CTG GGC ACG GTC AAA TTA AAC GGG	1654
Val Leu Val Leu Ile His Leu Gly Leu Gly Thr Val Lys Leu Asn Gly	
500 505 510	
ACT GGC TTT GTC AGC TAT GTT GAA GAG GGC AGC CAG GTA GAA GCC GGC	1702
Thr Gly Phe Val Ser Tyr Val Glu Glu Gly Ser Gln Val Glu Ala Gly	
515 520 525	
CAG CAG ATC CTG GAA TTC TGG GAC CCG GCG ATC AAG CAG GCC AAG CTG	1750
Gln Gln Ile Leu Glu Phe Trp Asp Pro Ala Ile Lys Gln Ala Lys Leu	
530 535 540	
GAC GAC ACG GTA ATC GTG ACC GTC ATC AAC AGC GAA ACT TTC GCA AAT	1798
Asp Asp Thr Val Ile Val Thr Val Ile Asn Ser Glu Thr Phe Ala Asn	



545	550	555	
AGC CAG ATG CTC TTG CCG ATC GGC CAC AGC GTC CAA GCC CTG GAT GAT			1846
Ser Gln Met Leu Leu Pro Ile Gly His Ser Val Gln Ala Leu Asp Asp			
560	565	570	575
GTA TTC AAG TTA GAA GGG AAG AAT TAG AAA ATG AGC AAT AAG TTA GTA			1894
Val Phe Lys Leu Glu Gly Lys Asn *	Met Ser Asn Lys Leu Val		
580	1	5	
AAA GAA AAA AGA GTT GAC CAG GCA GAC TTG GCC TGG CTG ACT GAC CCG			1942
Lys Glu Lys Arg Val Asp Gln Ala Asp Leu Ala Trp Leu Thr Asp Pro			
10	15	20	
GAA GTT TAC GAA GTC AAT ACA ATT CCC CCG CAC TCC GAC CAT GAG TCC			1990
Glu Val Tyr Glu Val Asn Thr Ile Pro Pro His Ser Asp His Glu Ser			
25	30	35	
TTC CAA AGC CAG GAA GAA CTG GAG GAG GGC AAG TCC AGT TTA GTG CAG			2038
Phe Gln Ser Gln Glu Glu Leu Glu Glu Gly Lys Ser Ser Leu Val Gln			
40	45	50	
TCC CTG GAC GGG GAC TGG CTG ATT GAC TAC GCT GAA AAC GGC CAG GGA			2086
Ser Leu Asp Gly Asp Trp Leu Ile Asp Tyr Ala Glu Asn Gly Gln Gly			
55	60	65	70
CCA GTC AAC TTC TAT GCA GAA GAC TTT GAC GAT AGC AAT TTT AAG TCA			2134
Pro Val Asn Phe Tyr Ala Glu Asp Phe Asp Asp Ser Asn Phe Lys Ser			
75	80	85	
GTC AAA GTA CCC GGC AAC CTG GAA CTG CAA GGC TTT GGC CAG CCC CAG			2182
Val Lys Val Pro Gly Asn Leu Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Pro Gln			
90	95	100	
TAT GTC AAC GTC CAA TAT CCA TGG GAC GGC AGT GAG GAG ATT TTC CCG			2230
Tyr Val Asn Val Gln Tyr Pro Trp Asp Gly Ser Glu Glu Ile Phe Pro			
105	110	115	
CCC CAA ATT CCA AGC AAA AAT CCG CTC GCT TCT TAT GTC AGA TAC TTT			2278
Pro Gln Ile Pro Ser Lys Asn Pro Leu Ala Ser Tyr Val Arg Tyr Phe			
120	125	130	
GAC CTG GAT GAA GCT TTC TGG GAC AAG GAA GTC AGC TTG AAG TTT GAC			2326
Asp Leu Asp Glu Ala Phe Trp Asp Lys Glu Val Ser Leu Lys Phe Asp			
135	140	145	150
GGG GCG GCA ACA GCC ATC TAT GTC TGG CTG AAC GGC CAC TTC GTC GGC			2374
Gly Ala Ala Thr Ala Ile Tyr Val Trp Leu Asn Gly His Phe Val Gly			
155	160	165	
TAC GGG GAA GAC TCC TTT ACC CCA AGC GAG TTT ATG GTT ACC AAG TTC			2422
Tyr Gly Glu Asp Ser Phe Thr Pro Ser Glu Phe Met Val Thr Lys Phe			
170	175	180	
CTC AAG AAA GAA AAT AAC CGC CTG GCA GTG GCT CTC TAC AAG TAT TCT			2470

Leu	Lys	Lys	Glu	Asn	Asn	Arg	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Ser	
	185						190					195				
TCC	GCC	TCC	TGG	CTG	GAA	GAC	CAG	GAC	TTC	TGG	CGC	ATG	TCT	GGT	TTG	2518
Ser	Ala	Ser	Trp	Leu	Glu	Asp	Gln	Asp	Phe	Trp	Arg	Met	Ser	Gly	Leu	
	200					205					210					
TTC	AGA	TCA	GTG	ACT	CTT	CAG	GCC	AAG	CCG	CGT	CTG	CAC	TTG	GAG	GAC	2566
Phe	Arg	Ser	Val	Thr	Leu	Gln	Ala	Lys	Pro	Arg	Leu	His	Leu	Glu	Asp	
215					220					225					230	
CTT	AAG	CTT	ACG	GCC	AGC	TTG	ACC	GAT	AAC	TAC	CAA	AAA	GGA	AAG	CTG	2614
Leu	Lys	Leu	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Asp	Asn	Tyr	Gln	Lys	Gly	Lys	Leu	
				235					240					245		
GAA	GTC	GAA	GCC	AAT	ATT	GCC	TAC	CGC	TTG	CCA	AAT	GCC	AGC	TTT	AAG	2662
Glu	Val	Glu	Ala	Asn	Ile	Ala	Tyr	Arg	Leu	Pro	Asn	Ala	Ser	Phe	Lys	
			250					255					260			
CTG	GAA	GTG	CGG	GAT	AGT	GAA	GGT	GAC	TTG	GTT	GCT	GAA	AAG	CTG	GGC	2710
Leu	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	Glu	Gly	Asp	Leu	Val	Ala	Glu	Lys	Leu	Gly	
		265					270					275				
CCA	ATC	AGA	AGC	GAG	CAG	CTG	GAA	TTC	ACT	CTG	GCT	GAT	TTG	CCA	GTA	2758
Pro	Ile	Arg	Ser	Glu	Gln	Leu	Glu	Phe	Thr	Leu	Ala	Asp	Leu	Pro	Val	
	280					285					290					
GCT	GCC	TGG	AGC	GCG	GAA	AAG	CCT	AAC	CTT	TAC	CAG	GTC	CGC	CTG	TAT	2806
Ala	Ala	Trp	Ser	Ala	Glu	Lys	Pro	Asn	Leu	Tyr	Gln	Val	Arg	Leu	Tyr	
295					300					305					310	
TTA	TAC	CAG	GCA	GGC	AGC	CTC	TTA	GAG	GTT	AGC	CGG	CAG	GAA	GTG	GGT	2854
Leu	Tyr	Gln	Ala	Gly	Ser	Leu	Leu	Glu	Val	Ser	Arg	Gln	Glu	Val	Gly	
				315					320					325		
TTC	CGC	AAC	TTT	GAA	CTA	AAA	GAC	GGG	ATT	ATG	TAC	CTT	AAC	GGC	CAG	2902
Phe	Arg	Asn	Phe	Glu	Leu	Lys	Asp	Gly	Ile	Met	Tyr	Leu	Asn	Gly	Gln	
		330						335					340			
CGG	ATC	GTC	TTC	AAG	GGG	GCC	AAC	CGG	CAC	GAA	TTT	GAC	AGT	AAG	TTG	2950
Arg	Ile	Val	Phe	Lys	Gly	Ala	Asn	Arg	His	Glu	Phe	Asp	Ser	Lys	Leu	
		345					350					355				
GGC	CGG	GCT	ATC	ACA	GAA	GAG	GAT	ATG	ATC	TGG	GAT	ATC	AAG	ACC	ATG	2998
Gly	Arg	Ala	Ile	Thr	Glu	Glu	Asp	Met	Ile	Trp	Asp	Ile	Lys	Thr	Met	
	360					365					370					
AAG	CGA	AGC	AAC	ATC	AAT	GCT	GTC	CGC	TGC	TCT	CAC	TAC	CCG	AAC	CAG	3046
Lys	Arg	Ser	Asn	Ile	Asn	Ala	Val	Arg	Cys	Ser	His	Tyr	Pro	Asn	Gln	
375					380				385						390	
TCC	CTC	TTT	TAC	CGG	CTC	TGT	GAC	AAG	TAC	GGC	CTT	TAC	GTC	ATT	GAT	3094
Ser	Leu	Phe	Tyr	Arg	Leu	Cys	Asp	Lys	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Val	Ile	Asp	
				395					400					405		

GAA GCT AAC CTG GAA AGC CAC GGC ACC TGG GAA AAA GTG GGG GGG CAC Glu Ala Asn Leu Glu Ser His Gly Thr Trp Glu Lys Val Gly Gly His 410 415 420	3142
GAA GAT CCT AGC TTC AAT GTT CCA GGC GAT GAC CAG CAT TGG CTG GGA Glu Asp Pro Ser Phe Asn Val Pro Gly Asp Asp Gln His Trp Leu Gly 425 430 435	3190
GCC AGC TTA TCC CGG GTG AAG AAC ATG ATG GCT CGG GAC AAG AAC CAT Ala Ser Leu Ser Arg Val Lys Asn Met Met Ala Arg Asp Lys Asn His 440 445 450	3238
GCT TCA ATC CTG ATC TGG TCT TTA GGC AAT GAG TCT TAC GCC GGC ACT Ala Ser Ile Leu Ile Trp Ser Leu Gly Asn Glu Ser Tyr Ala Gly Thr 455 460 465 470	3286
GTC TTT GCC CAA ATG GCT GAT TAC GTC CGG AAG GCT GAT CCG ACC CGG Val Phe Ala Gln Met Ala Asp Tyr Val Arg Lys Ala Asp Pro Thr Arg 475 480 485	3334
GTT CAG CAC TAT GAA GGG GTG ACC CAC AAC CGG AAG TTT GAC GAC GCC Val Gln His Tyr Glu Gly Val Thr His Asn Arg Lys Phe Asp Asp Ala 490 495 500	3382
ACC CAG ATT GAA AGC CGG ATG TAT GCT CCG GCC AAG GTA ATT GAA GAA Thr Gln Ile Glu Ser Arg Met Tyr Ala Pro Ala Lys Val Ile Glu Glu 505 510 515	3430
TAC TTG ACC AAT AAA CCA GCC AAG CCA TTT ATC TCA GTT GAA TAC GCT Tyr Leu Thr Asn Lys Pro Ala Lys Pro Phe Ile Ser Val Glu Tyr Ala 520 525 530	3478
CAC GCC ATG GGC AAC TCC GTC GGT GAC CTG GCC GCC TAC ACG GCC CTG His Ala Met Gly Asn Ser Val Gly Asp Leu Ala Ala Tyr Thr Ala Leu 535 540 545 550	3526
GAA AAA TAC CCC CAC TAC CAG GGC GGC TTC ATC TGG GAC TGG ATT GAC Glu Lys Tyr Pro His Tyr Gln Gly Gly Phe Ile Trp Asp Trp Ile Asp 555 560 565	3574
CAA GGA CTG GAA AAA GAC GGG CAC CTG CTT TAT GGG GGC GAC TTC GAT Gln Gly Leu Glu Lys Asp Gly His Leu Leu Tyr Gly Gly Asp Phe Asp 570 575 580	3622
GAC CGG CCA ACC GAC TAT GAA TTC TGC GGG AAC GGC CTG GTC TTT GCT Asp Arg Pro Thr Asp Tyr Glu Phe Cys Gly Asn Gly Leu Val Phe Ala 585 590 595	3670
GAC CGG ACT GAA TCG CCG AAA CTG GCT AAT GTC AAG GCC CTT TAC GCC Asp Arg Thr Glu Ser Pro Lys Leu Ala Asn Val Lys Ala Leu Tyr Ala 600 605 610	3718
AAC CTT AAG TTA GAA GTA AAA GAT GGG CAG CTC TTC CTC AAA AAC GAC Asn Leu Lys Leu Glu Val Lys Asp Gly Gln Leu Phe Leu Lys Asn Asp 615 620 625 630	3766

AAT TTA TTT ACC AAC AGC TCA TCT TAC TAC TTC TTG ACT AGT CTT TTG Asn Leu Phe Thr Asn Ser Ser Ser Tyr Tyr Phe Leu Thr Ser Leu Leu 635 640 645	3814
GTC GAT GGC AAG TTG ACC TAC CAG AGC CGG CCT CTG ACC TTT GGC CTG Val Asp Gly Lys Leu Thr Tyr Gln Ser Arg Pro Leu Thr Phe Gly Leu 650 655 660	3862
GAG CCT GGC GAA TCC GGG ACC TTT GCC CTG CCT TGG CCG GAA GTC GCT Glu Pro Gly Glu Ser Gly Thr Phe Ala Leu Pro Trp Pro Glu Val Ala 665 670 675	3910
GAT GAA AAA GGA GAG GTC GTC TAC CGG GTA ACG GCC CAC TTA AAA GAA Asp Glu Lys Gly Glu Val Val Tyr Arg Val Thr Ala His Leu Lys Glu 680 685 690	3958
GAC TTG CCT TGG GCG GAT GAG GGC TTC ACT GTG GCT GAA GCA GAA GAA Asp Leu Pro Trp Ala Asp Glu Gly Phe Thr Val Ala Glu Ala Glu Glu 695 700 705 710	4006
GTA GCT CAA AAG CTG CCG GAA TTT AAG CCG GAA GGG CCG CCA GAT TTA Val Ala Gln Lys Leu Pro Glu Phe Lys Pro Glu Gly Arg Pro Asp Leu 715 720 725	4054
GTT GAT TCC GAC TAC AAC CTA GGC CTG AAA GGA AAT AAC TTC CAA ATT Val Asp Ser Asp Tyr Asn Leu Gly Leu Lys Gly Asn Asn Phe Gln Ile 730 735 740	4102
CTC TTC TCC AAG GTC AAG GGC TGG CCG GTT TCC CTC AAG TAT GCC GGT Leu Phe Ser Lys Val Lys Gly Trp Pro Val Ser Leu Lys Tyr Ala Gly 745 750 755	4150
AGG GAA TAC TTG AAG CGG CTG CCG GAA TTT ACC TTC TGG CCG GCC CTG Arg Glu Tyr Leu Lys Arg Leu Pro Glu Phe Thr Phe Trp Arg Ala Leu 760 765 770	4198
ACG GAC AAC GAC CGG GGA GCT GGT TAC GGC TAT GAT CTG GCC CGG TGG Thr Asp Asn Asp Arg Gly Ala Gly Tyr Gly Tyr Asp Leu Ala Arg Trp 775 780 785 790	4246
GAA AAT GCC GGC AAG TAT GCC CGC TTG AAA GAC ATC AGC TGC GAG GTC Glu Asn Ala Gly Lys Tyr Ala Arg Leu Lys Asp Ile Ser Cys Glu Val 795 800 805	4294
AAG GAA GAC TCC GTT TTG GTC AAG ACT GCC TTT ACG TTG CCT GTC GCC Lys Glu Asp Ser Val Leu Val Lys Thr Ala Phe Thr Leu Pro Val Ala 810 815 820	4342
TTA AAG GGT GAT TTA ACT GTG ACC TAT GAA GTC GAT GGA CGG GGC AAG Leu Lys Gly Asp Leu Thr Val Thr Tyr Glu Val Asp Gly Arg Gly Lys 825 830 835	4390
ATT GCT GTA ACA GCT GAC TTC CCA GGC GCG GAA GAA GCC GGT CTC TTG Ile Ala Val Thr Ala Asp Phe Pro Gly Ala Glu Glu Ala Gly Leu Leu	4438

840	845	850	
CCA GCC TTT GGC TTG AAC CTG GCC CTG CCA AAA GAA CTG ACC GAT TAC			4486
Pro Ala Phe Gly Leu Asn Leu Ala Leu Pro Lys Glu Leu Thr Asp Tyr			
855	860	865	870
CGC TAC TAT GGT CTG GGA CCT AAT GAG AGC TAA CCAGACCGCT TGGAAGGTAA			4539
Arg Tyr Tyr Gly Leu Gly Pro Asn Glu Ser *			
875	880		
TTACCTGGGC ATCTACCAGG GAGCGGTAAA AAAGAACTTT AGCCCATACC TGCGTCCGCA			4599
GGAAACGGGC AACCGGAGCA AGGTTCTGCTG GTACCAGCTC TTTGATGAAA AGGGCGGCTT			4659
GGAATTTACG GCCAATGGGG CAGACTTGAA CTTGTCTGCT TTGCCATATT CTGCCGCCCA			4719
AATTGAAGCA GCGGACCACG CTTTGAACCT GACTAACAAT TACACTTGGG TTAGAGCCTT			4779
AAGCGCCCAG ATGGGGGTCG GCGGGGATGA CTCCTGGGGG CAGAAGGTCC ACCCGGAATT			4839
CTGCCTGGAT GCTCAAAAAG CCCGCCAGCT CCGCCTGGTG ATTCAGCCCC TTTTACTAAA			4899
ATAAATGCTA CAATTGACTT AACAGGATGA AATTTTAGTA AAAGCAAAGC GAGTGAGGAA			4959
GATGGCAACG ATCAGAGAAG TGCCAAGGCA GCCGGCGTGT CGCTAGCGAC GGTTTCCCGC			5019
GTCTTGAACCT ATGACCAGAC CCTGTCTAGTC AATGAGGCAA			5059

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 584 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met	Ile	Phe	Ile	Ile	Thr	Asn	Leu	Ile	Thr	Ala	Ile	Arg	Ile	Gly	Glu
1				5					10					15	
Val	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Ile	Gly	Asn	Ala	Ile	Asp	Arg	Thr	Glu	Ser
			20					25					30		
Arg	Trp	Gly	Lys	Phe	Lys	Pro	Trp	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Ile	Ile	Ser
		35					40					45			
Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Gly	Gly	Ile	Asn	Gln
	50					55					60				
Ser	Asn	Pro	Val	Val	Tyr	Leu	Val	Ile	Phe	Gly	Ile	Val	Tyr	Leu	Ile
65					70					75				80	
Met	Asp	Ile	Phe	Tyr	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr	Gly	Phe	Trp	Ala	Met	Ile

85	90	95
Pro Ala Leu Ser Leu Asp Ser Arg Glu Arg Glu Lys Thr Ser Thr Phe 100 105 110		
Ala Arg Val Gly Ser Thr Ile Gly Ala Asn Leu Val Gly Val Val Ile 115 120 125		
Thr Pro Ile Ile Leu Phe Phe Ser Ala Ser Lys Ala Asn Pro Asn Gly 130 135 140		
Asp Lys Gln Gly Trp Phe Phe Phe Ala Leu Ile Val Ala Ile Val Gly 145 150 155 160		
Ile Leu Thr Ser Ile Thr Val Gly Leu Gly Thr His Glu Val Lys Ser 165 170 175		
Ala Leu Arg Glu Ser Asn Glu Lys Thr Thr Leu Lys Gln Val Phe Lys 180 185 190		
Val Leu Gly Gln Asn Asp Gln Leu Leu Trp Leu Ala Phe Ala Tyr Trp 195 200 205		
Phe Tyr Gly Leu Gly Ile Asn Thr Leu Asn Ala Leu Gln Leu Tyr Tyr 210 215 220		
Phe Ser Tyr Ile Leu Gly Asp Ala Arg Gly Tyr Ser Leu Leu Tyr Thr 225 230 235 240		
Ile Asn Thr Phe Val Gly Leu Ile Ser Ala Ser Phe Phe Pro Ser Leu 245 250 255		
Ala Lys Lys Phe Asn Arg Asn Arg Leu Phe Tyr Ala Cys Ile Ala Val 260 265 270		
Met Leu Leu Gly Ile Gly Val Phe Ser Val Ala Ser Gly Ser Leu Ala 275 280 285		
Leu Ser Leu Val Gly Ala Glu Phe Phe Phe Ile Pro Gln Pro Leu Ala 290 295 300		
Phe Leu Val Val Leu Met Ile Ile Ser Asp Ala Val Glu Tyr Gly Gln 305 310 315 320		
Leu Lys Thr Gly His Arg Asp Glu Ala Leu Thr Leu Ser Val Arg Pro 325 330 335		
Leu Val Asp Lys Leu Gly Gly Ala Leu Ser Asn Trp Phe Val Ser Leu 340 345 350		
Ile Ala Leu Thr Ala Gly Met Thr Thr Gly Ala Thr Ala Ser Thr Ile 355 360 365		
Thr Ala His Gly Gln Met Val Phe Lys Leu Ala Met Phe Ala Leu Pro 370 375 380		

Ala Val Met Leu Leu Ile Ala Val Ser Ile Phe Ala Lys Lys Val Phe  
 385 390 395 400

Leu Thr Glu Glu Lys His Ala Glu Ile Val Asp Gln Leu Glu Thr Gln  
 405 410 415

Phe Ser Gln Ser His Ala Gln Lys Pro Ala Gln Ala Glu Ser Phe Thr  
 420 425 430

Leu Ala Ser Pro Val Ser Gly Gln Leu Met Asn Leu Asp Met Val Asp  
 435 440 445

Asp Pro Val Phe Ala Asp Lys Lys Leu Gly Asp Gly Phe Ala Leu Val  
 450 455 460

Pro Ala Asp Gly Lys Val Tyr Ala Pro Phe Ala Gly Thr Val Arg Gln  
 465 470 475 480

Leu Ala Lys Thr Arg His Ser Ile Val Leu Glu Asn Glu His Gly Val  
 485 490 495

Leu Val Leu Ile His Leu Gly Leu Gly Thr Val Lys Leu Asn Gly Thr  
 500 505 510

Gly Phe Val Ser Tyr Val Glu Glu Gly Ser Gln Val Glu Ala Gly Gln  
 515 520 525

Gln Ile Leu Glu Phe Trp Asp Pro Ala Ile Lys Gln Ala Lys Leu Asp  
 530 535 540

Asp Thr Val Ile Val Thr Val Ile Asn Ser Glu Thr Phe Ala Asn Ser  
 545 550 555 560

Gln Met Leu Leu Pro Ile Gly His Ser Val Gln Ala Leu Asp Asp Val  
 565 570 575

Phe Lys Leu Glu Gly Lys Asn \*  
 580

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 881 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Met Ser Asn Lys Leu Val Lys Glu Lys Arg Val Asp Gln Ala Asp Leu  
 1 5 10 15

Ala Trp Leu Thr Asp Pro Glu Val Tyr Glu Val Asn Thr Ile Pro Pro  
 20 25 30

His Ser Asp His Glu Ser Phe Gln Ser Gln Glu Glu Leu Glu Glu Gly  
 35 40 45  
 Lys Ser Ser Leu Val Gln Ser Leu Asp Gly Asp Trp Leu Ile Asp Tyr  
 50 55 60  
 Ala Glu Asn Gly Gln Gly Pro Val Asn Phe Tyr Ala Glu Asp Phe Asp  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Asn Phe Lys Ser Val Lys Val Pro Gly Asn Leu Glu Leu Gln  
 85 90 95  
 Gly Phe Gly Gln Pro Gln Tyr Val Asn Val Gln Tyr Pro Trp Asp Gly  
 100 105 110  
 Ser Glu Glu Ile Phe Pro Pro Gln Ile Pro Ser Lys Asn Pro Leu Ala  
 115 120 125  
 Ser Tyr Val Arg Tyr Phe Asp Leu Asp Glu Ala Phe Trp Asp Lys Glu  
 130 135 140  
 Val Ser Leu Lys Phe Asp Gly Ala Ala Thr Ala Ile Tyr Val Trp Leu  
 145 150 155 160  
 Asn Gly His Phe Val Gly Tyr Gly Glu Asp Ser Phe Thr Pro Ser Glu  
 165 170 175  
 Phe Met Val Thr Lys Phe Leu Lys Lys Glu Asn Asn Arg Leu Ala Val  
 180 185 190  
 Ala Leu Tyr Lys Tyr Ser Ser Ala Ser Trp Leu Glu Asp Gln Asp Phe  
 195 200 205  
 Trp Arg Met Ser Gly Leu Phe Arg Ser Val Thr Leu Gln Ala Lys Pro  
 210 215 220  
 Arg Leu His Leu Glu Asp Leu Lys Leu Thr Ala Ser Leu Thr Asp Asn  
 225 230 235 240  
 Tyr Gln Lys Gly Lys Leu Glu Val Glu Ala Asn Ile Ala Tyr Arg Leu  
 245 250 255  
 Pro Asn Ala Ser Phe Lys Leu Glu Val Arg Asp Ser Glu Gly Asp Leu  
 260 265 270  
 Val Ala Glu Lys Leu Gly Pro Ile Arg Ser Glu Gln Leu Glu Phe Thr  
 275 280 285  
 Leu Ala Asp Leu Pro Val Ala Ala Trp Ser Ala Glu Lys Pro Asn Leu  
 290 295 300  
 Tyr Gln Val Arg Leu Tyr Leu Tyr Gln Ala Gly Ser Leu Leu Glu Val  
 305 310 315 320



Ser Arg Gln Glu Val Gly Phe Arg Asn Phe Glu Leu Lys Asp Gly Ile  
 325 330 335  
 Met Tyr Leu Asn Gly Gln Arg Ile Val Phe Lys Gly Ala Asn Arg His  
 340 345 350  
 Glu Phe Asp Ser Lys Leu Gly Arg Ala Ile Thr Glu Glu Asp Met Ile  
 355 360 365  
 Trp Asp Ile Lys Thr Met Lys Arg Ser Asn Ile Asn Ala Val Arg Cys  
 370 375 380  
 Ser His Tyr Pro Asn Gln Ser Leu Phe Tyr Arg Leu Cys Asp Lys Tyr  
 385 390 395 400  
 Gly Leu Tyr Val Ile Asp Glu Ala Asn Leu Glu Ser His Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Glu Lys Val Gly Gly His Glu Asp Pro Ser Phe Asn Val Pro Gly Asp  
 420 425 430  
 Asp Gln His Trp Leu Gly Ala Ser Leu Ser Arg Val Lys Asn Met Met  
 435 440 445  
 Ala Arg Asp Lys Asn His Ala Ser Ile Leu Ile Trp Ser Leu Gly Asn  
 450 455 460  
 Glu Ser Tyr Ala Gly Thr Val Phe Ala Gln Met Ala Asp Tyr Val Arg  
 465 470 475 480  
 Lys Ala Asp Pro Thr Arg Val Gln His Tyr Glu Gly Val Thr His Asn  
 485 490 495  
 Arg Lys Phe Asp Asp Ala Thr Gln Ile Glu Ser Arg Met Tyr Ala Pro  
 500 505 510  
 Ala Lys Val Ile Glu Glu Tyr Leu Thr Asn Lys Pro Ala Lys Pro Phe  
 515 520 525  
 Ile Ser Val Glu Tyr Ala His Ala Met Gly Asn Ser Val Gly Asp Leu  
 530 535 540  
 Ala Ala Tyr Thr Ala Leu Glu Lys Tyr Pro His Tyr Gln Gly Gly Phe  
 545 550 555 560  
 Ile Trp Asp Trp Ile Asp Gln Gly Leu Glu Lys Asp Gly His Leu Leu  
 565 570 575  
 Tyr Gly Gly Asp Phe Asp Asp Arg Pro Thr Asp Tyr Glu Phe Cys Gly  
 580 585 590  
 Asn Gly Leu Val Phe Ala Asp Arg Thr Glu Ser Pro Lys Leu Ala Asn  
 595 600 605  
 Val Lys Ala Leu Tyr Ala Asn Leu Lys Leu Glu Val Lys Asp Gly Gln

610	615	620
Leu Phe Leu Lys Asn Asp Asn Leu Phe Thr Asn Ser Ser Ser Tyr Tyr		
625	630	635 640
Phe Leu Thr Ser Leu Leu Val Asp Gly Lys Leu Thr Tyr Gln Ser Arg		
645	650	655
Pro Leu Thr Phe Gly Leu Glu Pro Gly Glu Ser Gly Thr Phe Ala Leu		
660	665	670
Pro Trp Pro Glu Val Ala Asp Glu Lys Gly Glu Val Val Tyr Arg Val		
675	680	685
Thr Ala His Leu Lys Glu Asp Leu Pro Trp Ala Asp Glu Gly Phe Thr		
690	695	700
Val Ala Glu Ala Glu Glu Val Ala Gln Lys Leu Pro Glu Phe Lys Pro		
705	710	715 720
Glu Gly Arg Pro Asp Leu Val Asp Ser Asp Tyr Asn Leu Gly Leu Lys		
725	730	735
Gly Asn Asn Phe Gln Ile Leu Phe Ser Lys Val Lys Gly Trp Pro Val		
740	745	750
Ser Leu Lys Tyr Ala Gly Arg Glu Tyr Leu Lys Arg Leu Pro Glu Phe		
755	760	765
Thr Phe Trp Arg Ala Leu Thr Asp Asn Asp Arg Gly Ala Gly Tyr Gly		
770	775	780
Tyr Asp Leu Ala Arg Trp Glu Asn Ala Gly Lys Tyr Ala Arg Leu Lys		
785	790	795 800
Asp Ile Ser Cys Glu Val Lys Glu Asp Ser Val Leu Val Lys Thr Ala		
805	810	815
Phe Thr Leu Pro Val Ala Leu Lys Gly Asp Leu Thr Val Thr Tyr Glu		
820	825	830
Val Asp Gly Arg Gly Lys Ile Ala Val Thr Ala Asp Phe Pro Gly Ala		
835	840	845
Glu Glu Ala Gly Leu Leu Pro Ala Phe Gly Leu Asn Leu Ala Leu Pro		
850	855	860
Lys Glu Leu Thr Asp Tyr Arg Tyr Tyr Gly Leu Gly Pro Asn Glu Ser		
865	870	875 880

•

## REVENDICATIONS

- 1) Souche mutante de *L. bulgaricus* dépourvue d'activité  $\beta$ -galactosidase, caractérisée en ce qu'elle  
5 porte une mutation non-sens, dans au moins l'une des séquences codantes de l'opéron lactose
- 2) Souche mutante de *L. bulgaricus* selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence codante est la séquence codant pour la  $\beta$ -galactosidase.
- 10 3) Souche mutante de *L. bulgaricus* selon une quelconque des revendications 1 ou 2, déposée le 8 janvier 1998, auprès de la CNCM sous le numéro I-1968.
- 4) Ferment lactique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche de *L. bulgaricus* selon une  
15 quelconque des revendications 1 à 3.
- 5) Ferment lactique selon la revendication 4 caractérisé en ce que ladite souche de *L. bulgaricus* est associée à au moins une souche de *S. thermophilus*.
- 6) Procédé de préparation d'un produit laitier  
20 fermenté, caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on fermente du lait à l'aide d'un ferment lactique comprenant au moins une souche de *L. bulgaricus* selon une quelconque des revendications 1 à 3, en présence d'au moins un sucre assimilable par ladite  
25 souche
- 7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit sucre assimilable est le glucose.
- 8) Procédé selon une quelconque des  
30 revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que l'arrêt de la fermentation s'effectue sans refroidissement dudit produit laitier.
- 9) Produit laitier fermenté susceptible d'être obtenu par un procédé selon une quelconque des  
35 revendications 6 à 8.

10) Produit laitier fermenté selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit produit est un yoghourt.

## REVENDEICATIONS

- 1) Souche mutante de *L. bulgaricus* dépourvue d'activité  $\beta$ -galactosidase, caractérisée en ce qu'elle porte une mutation non-sens, dans au moins l'une des séquences codantes de l'opéron lactose
- 2) Souche mutante de *L. bulgaricus* selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence codante est la séquence codant pour la  $\beta$ -galactosidase.
- 3) Souche mutante de *L. bulgaricus* selon une quelconque des revendications 1 ou 2, déposée le 14 janvier 1998, auprès de la CNCM sous le numéro I-1968.
- 4) Ferment lactique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche de *L. bulgaricus* selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 5) Ferment lactique selon la revendication 4 caractérisé en ce que ladite souche de *L. bulgaricus* est associée à au moins une souche de *S. thermophilus*.
- 6) Procédé de préparation d'un produit laitier fermenté, caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on fermente du lait à l'aide d'un ferment lactique comprenant au moins une souche de *L. bulgaricus* selon une quelconque des revendications 1 à 3, en présence d'au moins un sucre assimilable par ladite souche
- 7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit sucre assimilable est le glucose.
- 8) Procédé selon une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que l'arrêt de la fermentation s'effectue sans refroidissement dudit produit laitier.
- 9) Produit laitier fermenté susceptible d'être obtenu par un procédé selon une quelconque des revendications 6 à 8.

FIGURE 1

